

**Zum Status des cytosolischen NAD-Systems
in der hämoglobinfrei perfundierten
Rattenleber**

**TA, Sioe Tjin
(Rachmat, Rafael)**

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. Th. Bücher

Zum Status des cytosolischen NAD-Systems in der
hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
TA, Sio Tjin (Rafael Rachmat)
aus
Medan, Indonesien

München 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.6.1973



Zum Status des cytosolischen NAD-Systems in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber

=====

1. Einleitung

Der Reduktionsgrad der pyridinnukleotidabhängigen Redoxsysteme hat für die biologische Oxidation bzw. für synthetische Leistungen der Zelle eine zentrale Bedeutung. Eine moderne Physiologie der Leberzelle ist ohne Berücksichtigung der kompartmentell lokalisierten Redoxpotentiale bzw. -potentialdifferenzen undenkbar.

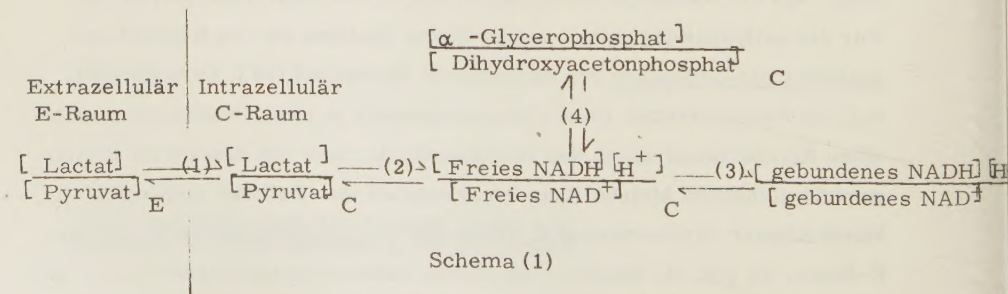
In einer grundlegenden Arbeit über die Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation faßten Bücher und Klingenberg im Jahre 1958 die Kenntnisse über die NAD- und NADP-abhängigen Systeme zusammen [1]. Aus der Vielzahl der dort behandelten Probleme sei folgendes für die Zwecke der vorliegenden Arbeit herausgegriffen: Der Stoffwechsel läuft in spezifischen Räumen, Kompartimenten, ab; die in diesem Zusammenhang wichtigsten sind der extrazelluläre Raum (E-Raum), der cytosolische Raum (C-Raum, früher auch cytoplasmatischer Raum genannt), und der mitochondriale Raum (M-Raum). Biochemisch sind diese Räume durch spezifische Enzym-, Coenzym- und Metabolitmuster zu charakterisieren. Man kann daher beispielsweise von cytosolischen und von mitochondrialen NAD-Systemen sprechen unter der - experimentell belegten - Voraussetzung, daß die trennende Membran für NADH und NAD impermeabel ist. Für die zellphysiologische Analyse dieser Systeme ist das Konzept der Indikatormetabolitpaare von besonderem Interesse [1-4]. Es beinhaltet, daß das Redoxpotential eines Coenzymsystems in einem bestimmten zellulären Kompartiment durch das Redoxpotential eines mit diesem im Gleichgewicht stehenden Metabolitpaares anzugeben ist. Befindet sich solch ein Metabolitpaar darüberhinaus in einem Permeationsgleichgewicht mit dem E-Raum, so gibt die Bestimmung dieses Indikatormetabolitpaares z.B. im Blutplasma oder in Perfusionslösungen ohne Zerstörung des Gewebes bei Verwendung der Nernstschen Gleichung direkt das Redoxpotential am Ort

der das System ins Gleichgewicht setzenden Enzymaktivität an:

$$E' = E'_o - \frac{R T}{n F} \times \ln \frac{[\text{Ind. red}]}{[\text{Ind. ox}]} \quad (\text{in mV}) \quad (1)$$

Unter Verwendung des Indikatormetabolitpaares [Laktat]/Pyruvat ergab sich eine wichtige Diskrepanz zwischen den berechneten Quotienten $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ und dem Quotienten der analytisch bestimmten Gewebsgehalte $\{\text{NADH}\}/\{\text{NAD}^+\}$: die ersteren lagen um bis zu drei Größenordnungen niedriger als letztere, das mit der Laktatdehydrogenase im Gleichgewicht befindliche cytosolische NAD-System liegt also auf einem um bis zu $3 \times 30,7$ mV positiveren Redoxpotential. Da in Gleichung (1) die Konzentrationen (Mole/Liter) eingehen, welche durch die Gewebsgehalte (Mole/Gramm Gewebe) nicht angezeigt werden (zumal diese über alle Gewebskompartimente summieren), werden auf diese Weise die zellphysiologisch entscheidenden freien Konzentrationen des NADH und NAD erfaßt. Ein Grund für die obengenannte Diskrepanz könnte also in der Existenz präferentieller Bindungsorte für NADH im Cytosol liegen. Bei entsprechender Dimensionierung hätte solch ein System vom Bindungsorten die Eigenschaft der Pufferung des NADH/NAD-Systems, ähnlich wie puffernde Anionbasen als H^+ -bindende Orte aufzufassen sind (vgl. [2] und Diskussion).

In der vorliegenden Arbeit sollen experimentelle Hinweise erbracht werden (a) für das Vorkommen der präferentiellen Bindung des NADH im Cytosol der intakten Leberzelle und (b) für die Äquilibrierung des Systems



wobei Schritt 1 ein Permeationsgleichgewicht und die Schritte 2-4 Reaktionsgleichgewichte darstellen. Dabei wird das Laktat/Pyruvat-System des E-Raums nicht wie bisher als Indikatorsystem verwendet, in der Richtung von rechts nach links in Schema (1), sondern der Quotient $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ im E-Raum wird als experimentelle Variable zur Erzwingung intrazellulärer Potentialänderungen verwendet; die Blickrichtung im Schema (1) geht also von links nach rechts.

Das experimentelle Objekt ist die isolierte, hämoglobinfrei durchströmte Rattenleber. Bei nicht-rezirkulierender, offener Perfusion ist der in die Leber tretende $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ -Quotient zu allen Zeiten des Experiments bekannt. An intrazellulären Parametern werden eine für Pyridinnukleotide spezifische Organfluorometrie und -spektrophotometrie, das Indikatormetabolitpaar $\{\alpha\text{-Glycerophosphat}\} / \{\text{Dihydroxyacetonphosphat}\}$ und Gewebsgehalte der Pyridinnukleotide verwendet. Extrazelluläre Parameter sind das Paar $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ und der pH im austretenden Perfusat. Mit diesen Parametern wird Information über die 4 Schritte in Schema (1) erhalten.

Der theoretische Ansatz geht von der Annahme aus, daß die mit den optischen Methoden beobachteten inkrementellen Konzentrationsänderungen des cytosolischen NADH, welche als Folge von Änderungen des $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ -Quotienten im E-Raum auftreten, im Sinne einer Redoxtitration ausgewertet werden können. (Schritte 1 - 3). Auf die Berechtigung dieser Annahme und auf die zugrundeliegenden Voraussetzungen wird im einzelnen einzugehen sein. Durch mathematische Extrapolation der Titrationsstufen auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes wird u. a. die apparente Massenwirkungskonstante des Systems und die NADH-Bindungskapazität des Cytosols erhalten [vgl. 5, 6].

Da eine Redoxtitration des Schrittes (4) in Schema (1) mit den oben geschilderten organphotometrischen Verfahren nicht möglich ist, werden die Gewebsgehalte von α -Glycerophosphat und Dihydroxyacetonphosphat in verschiedenen stationären Zuständen des extrazellulären $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ -Systems bestimmt. Der daraus resultierende Gewebsgehaltsquotient von $\{\alpha\text{-Glycerophosphat}\} / \{\text{Dihydroxyacetonphosphat}\}$ ist unter anderem deswegen von Interesse, weil dieses System, vermittelt durch das Enzym Glycerophosphat-Dehydrogenase (GDH), dem extrazellulären und zellulären $[\text{Laktat}]/[\text{Pyruvat}]$ -System nachgeschaltet ist.

2. Methodik

2.1. Hämoglobinfreie Perfusion der Rattenleber.

Es wurden weibliche Wistarratten von 100 - 150g Körpergewicht verwendet, die freundlicherweise von der Fa. Thomae, Biberach, zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere erhielten Altromin-Standardfutter.

In Pentobarbital-Narkose (50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) und nach Injektion von 5000 IE Heparin/kg Körpergewicht in die Femoralvene wird die Pfortader mit einem Polyäthylenschlauch kannuliert und somit an das Perfusionssystem angeschlossen. Das die Leber verlassende Perfusat wird über die Vena cava mit einem abführenden Schlauch abgeleitet. Die perfundierte Leber wird isoliert und auf einem geeigneten Perfusionstisch angebracht.

Die Perfusionsapparatur besteht aus einem Walzenoxygenator und einer Rollenpumpe. Der Oxygenator ist temperierbar. Die auf der Leberoberfläche mit einem Thermofühler gemessene Temperatur liegt konstant bei 33°C. Zugaben zum Perfusat werden über ein vor der Pfortader angebrachtes T-Stück mit Infusionspumpen eingebracht. Auf diese Weise können konstante, stufenweise regelbare Spiegel der infundierten Substanzen im eintretenden Perfusat aufrechterhalten werden.

Das Perfusat ist ein Bikarbonatsystem. Es enthält:

115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1,2 mM MgCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 1.2 mM Na_2SO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , und 25 mM NaHCO_3 .

Die Begasung erfolgt mit Carbogen [95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid]. Das in die Leber tretende Perfusat hat einen pH von 7,4. Das die Leber verlassende Perfusat durchläuft zwei Elektrodenkammern, in denen Sauerstoff und pH gemessen werden, und wird dann zur Bestimmung der Metabolite aufgefangen.

2.2 Kontinuierlich abgeleitete Parameter

2.2.1. Gleichzeitige Messung der pyridinnukleotidspezifischen Fluoreszenz und Absorption an der perfundierten Rattenleber

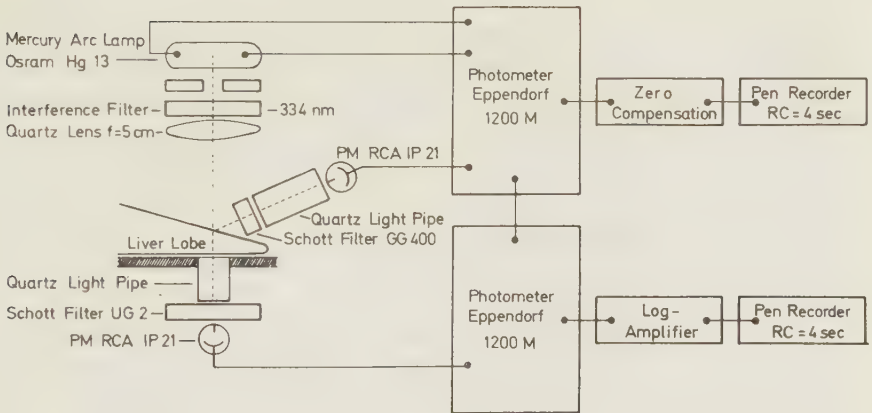


Abb. 1: Schematische Darstellung der Anordnung für die Fluoreszenz- und Absorptionsmessung an der perfundierten Rattenleber.

[Aus 5] .

Ein Lappen der perfundierten Leber wird mit Licht der Wellenlänge 334 nm bestrahlt. (Abb. 1). Dazu wird die 334 nm Linie einer Hg-Lampe (Osram Hg 13) mit einem Schott-Interferenzfilter isoliert. Das mit einer Quarzlinse fokussierte Licht tritt auf die Leberoberfläche als ein Lichtfleck von $2 \times 4 \text{ mm}^2$. Das von den oberflächlichen Zellagen ermittelte Fluoreszenzlicht (Halbwertstiefe des Excitationslichts ist ca. 0.2 mm) wird einem Photomultiplier (RCA 1 P 21) über ein Sekundärfilter (Schott GG 400) zugeleitet. Das durch den Leberlappen tretende Licht wird über ein Ultraviolettfilter (Schott UG 2) einem zweiten Photomultiplier zugeleitet. Die Fluoreszenz- und Absorptionssignale werden gleichzeitig mit Kompensationsschreibern gegen die Zeit registriert.

Die mit diesem Versuchsaufbau erhaltenen Signale sind linear proportional der Konzentration von zugesetztem NADH (vgl. den rechten Teil der Abb. (5) auf Seite 13) oder dansyliertem Rinderserumalbumin[5].

2.2.2 Messung von pH und $[O_2]$ im Perfusat

Der pH-Wert des abfließenden Perfusats wird mit einer Einstabmeßkette Ingold Ag 7.0 und einem Knick pH-Meter 291 gemessen, und mit einem Kompensationsschreiber gegen die Zeit registriert. Die Sauerstoff-Konzentration wird mit einer teflonbezogenen Ag-Pt-Elektrode bei einer Polarisationsspannung von 0.7 V gemessen, und mit einem Kompensationsschreiber gegen die Zeit registriert.

2.3 Metabolitbestimmungen

2.3.1 Perfusat.

1 ml des Perfusats wird mit 0.2 ml 2M Perchlorsäure enteiweißt und zentrifugiert. 1 ml des Überstands wird anschließend mit 0.1 ml 1.65 M $KHCO_3$ und 1 M Triäthanolamin neutralisiert. Vor Verwendung der Probe wird das ausgefallene Perchlorat abzentrifugiert.

A. L-Laktat. L-Lactat wird im optischen Test bei 366 nm in 0.4 M Hydrazin-Glykokoll-Puffer, pH 9.5, bestimmt.

B. Pyruvat. Pyruvat wird im optischen Test bei 334 nm in 0.5 M Triäthanolamin-Puffer, pH 7.6, der EDTA 5 mM enthält, bestimmt. Die teilweise geringen Pyruvatkonzentrationen erfordern den Einsatz großer Perfusatvolumina, um die Verdünnung im Test gering zu halten.

2.3.2 Gewebsanalytik.

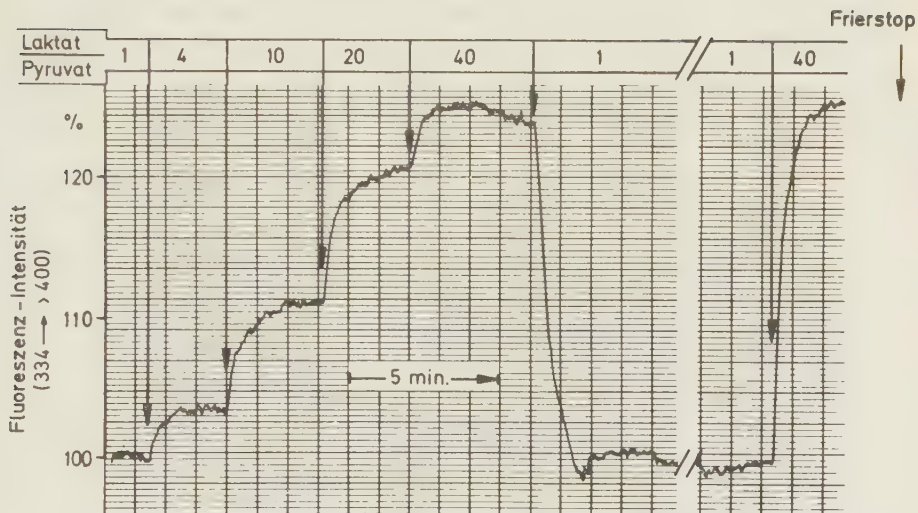


Abb. 2: Fluoreszenzinkremente bei NADH-spezifischen Wellenlängen (334 nm $\rightarrow$ 400 nm) bei verschiedenen extrazellulären [L] / [P]. Der Zeitpunkt des Frierstop bei [L] / [P] = 40 wird gezeigt.

Mit einer auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs abgekühlten Aluminiumzange wird der für die optischen Messungen (vgl. 2.2.1.) verwendete Leberlappen friergestoppt. Ein Beispiel zeigt die Abb. 2. Es wurde bei [L] / [P] = 40 friergestoppt. Dabei ist von Bedeutung, daß zum möglichst gleichmäßigen Durchfrieren eine Platte von 1 mm Dicke entsteht. Es werden auf diese Weise etwa 500 mg friergestopptes Gewebe gewonnen. Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs wird das Gewebe zu einem feinen Pulver mit einem Teflonmörser zerkleinert. Bei -20 bis -25°C wird das Gewebepulver in einem Zentrifugenbecher gewogen.

2.3.2.1. Saurer Extrakt (vgl. [7]). Unter kräftigem Rühren wird das gewogene Gewebspulver bei -20 bis -25°C mit 0.6 N alkoholischer Perchlorsäure (5 Volumenteile pro Gewichtsanteil) vermischt. Durch Beschallen mit einem MSE-Ultraschallgerät wird homogenisiert und nach 10 minütiger Zentrifugation bei $10.000\times g$ ein Extrakt-Überstand gewonnen. Dieser wird mit $1\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ vorneutralisiert und unter kräftigem Rühren mit 3 N KOH neutralisiert.

A. L-Laktat. L-Laktat wird wie bei 2.3.1.A im optischen Test bestimmt.

B. Pyruvat. Wegen der geringen Konzentration im Extrakt wird Pyruvat fluorimetrisch in einem Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzzusatz in $50\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 10 mM MgCl_2 , $\text{pH } 7.0$ mit Laktatdehydrogenase bestimmt.

C. L- α -Glycerophosphat. Auch dieser Metabolit wird fluorimetrisch bestimmt. Das Testsystem besteht aus $0,2\text{ M}$ Hydrazin, $0,5\text{ M}$ Glycoll, 5 mM EDTA, $\text{pH } 9,5$ und α -Glycerophosphat-Dehydrogenase. Ein Beispiel ist in Abb. 3 gegeben.

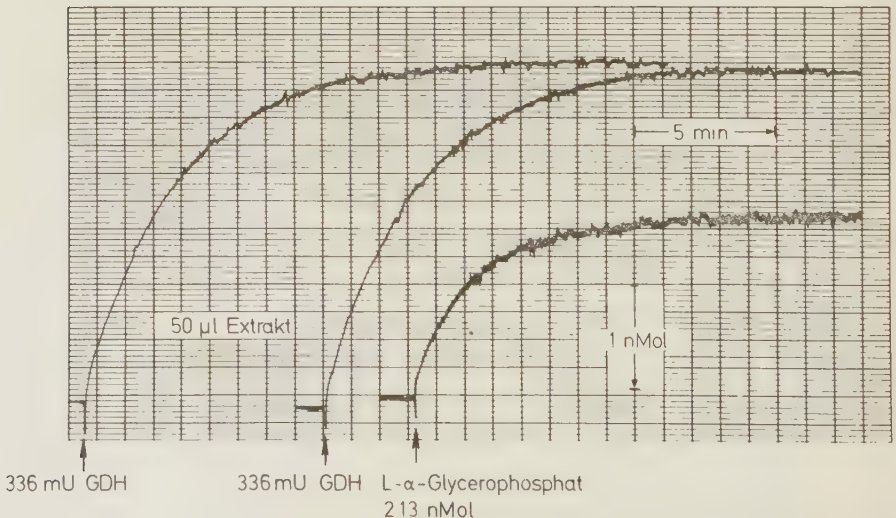


Abb.3: Fluorimetrischer Test zur Bestimmung der L- α -Glycerophosphat (G) im Lebergewebsextrakt. Als Standard wird 2,13 nMol G eingesetzt.

D. Dihydroxyacetonphosphat. Die fluorometrische Bestimmung muß bei diesem Metaboliten, dessen Gewebsgehalt sehr niedrig liegt, besonders empfindlich und genau sein. Wie Abb. 4 zeigt, können mit dem Testsystem, bestehend aus 0,5 M Triäthanolamin, 5 mM EDTA, pH 7,6 und α -Glycerophosphat-Dehydrogenase, noch Änderungen von 50 Picomolen erfaßt werden (vgl. Abb. 4).



Abb. 4: Fluorometrischer Test zur Bestimmung der Dihydroxyacetonphosphat (DAP) im Lebergewebsextrakt. Als Standard wird 0,44 nMol DAP eingesetzt.

E. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD). NAD wird fluorometrisch bestimmt. Das Testsystem besteht aus 0,1 M As_2O_3 und 0,1 M Hydrazinhydrat pH 9,6 und Alkohol Dehydrogenase aus Pferdeleber.

F. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat. NADP⁺ wird fluorometrisch bestimmt. Das Testsystem besteht aus 0,1 M Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 7,6 und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Die Fluoreszenz wird bei 366 nm angeregt und die Intensität der Wellenlängen 400-3000 nm wird registriert; $t = 25^\circ\text{C}$. Die für die fluorimetri-

schen Bestimmungen erforderlichen Fluoreszenzstandards werden durch Verdünnung von Stammlösungen erhalten, welche im optischen Test bestimmt werden. Die Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen, zum Teil auch als Proportionalbestimmungen durchgeführt. Proportionalität war auch bei Extrakten mit relativ hoher Eigenfluoreszenz zu beobachten. Der durch Zugabe von Enzym bei einigen Tests auftretende Fluoreszenzsprung wurde durch eine zweite Zugabe von Enzym nach Ablauf des Tests erfaßt und konnte somit korrigiert werden.

2.3.2.2. Alkalischer Extrakt (vgl. [7]). Unter kräftigem Rühren wird das gewogene Gewebspulver bei -20 bis -25°C mit $0,5\text{ N}$ alkoholischen KOH (8 Volumenanteile pro Gewichtsanteil) vermischt. Durch Beschallen wird homogenisiert und danach zentrifugiert. Der Extrakt wird mit Triäthanolamin-HCl-Phosphat-Mischung ($0,5\text{ M}$ Triäthanolamin, $0,4\text{ M}$ KH_2PO_4 , $0,1\text{ M}$ K_2HPO_4) 10 Min in 80°C -Wasserbad extrahiert, bis pH $7,8$ neutralisiert. Die langsame nicht enzymatische Oxydation von NADH und NADPH im alkalischen Extrakt wird dadurch verhindert, daß unmittelbar nach der Neutralisation NADH und NADPH mit der Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion zu NAD und NADP oxydiert werden und nach Perchlorsäurefällung der Glu-DH und Reneutralisation wie 2.3.2.1. E und F. gemessen

2.4. Inulin- ^{14}C -Carboxylat-Raum. Eine Lösung mit ^{14}C -markierter Inulin-Carbonsäure wird infundiert. Nach 5 Minuten ist die Radioaktivität des abfließenden Perfusats konstant. Dann wird eine Gewebprobe nach der oben geschilderten Frierstop-Methode sowie Perfusat entnommen. Nach saurer Hydrolyse der Inulin-Carbonsäure im Lebergewebsextrakt und in Perfusat (bei 80°C ca. 2 Stunden), wird die Radioaktivität nach Neutralisation im Szintillationszähler in einem Szintillatorgemisch (2 Volumenteile Toluol mit 1.4-bis(2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl))-Benzol $0,25\text{ gr/l}$ und 2,5-Di-phenyloxazol 5 gr/l und 1 Volumenanteil Methanol) gemessen. Der ^{14}C -Inulin-Carboxylat-Raum (ml/gr Leberfeuchtgewicht) wird berechnet aus dem Quotient der Radioaktivität der Gewebprobe (in Impulsen pro min pro gr) und der Radioaktivität des Perfusats (in Impulsen pro min pro ml).

2.5. Materialien. L(+)-Na-Laktat war von Roth, Karlsruhe. Na_2 -Glucose-6-Phosphat, Dihydroxyaceton-Phosphat-Dimethylketal, Na_3 -Glycerat-3-Phosphat, β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (β -NAD, Reinheitsgrad 1, freie Säure, β -NADH- Na_2 Reinheitsgrad 1), Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat- Na_2 (NADP und NADPH- Na_4) waren von Boehringer, Mannheim. Inulin- ^{14}C -Carbonsäure (8,6 m Ci/m Mol) war von The Radiochemical Centre, Amersham.

Alle Enzyme waren von Boehringer, Mannheim. Alle sonstigen Reagentien waren von Merck, Darmstadt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Änderung der NADH-spezifischen Fluoreszenz und Absorption mit dem extrazellulären [Laktat] / [Pyruvat] ([L] / [P])-Quotienten. Die Pyruvat-Konzentration [P] wird konstant bei 0,2 mM gehalten und die Laktat-Konzentration [L] wird zwischen 0,2 und 20 mM stufenweise variiert. Daraus ergeben sich im eintretenden Perfusat extrazellulären ([L] / [P])-Quotienten von 1 bis 100. Die Änderungen der Oberflächenfluoreszenz und der Absorption bei der NADH-spezifischen Wellenlänge 334 nm werden registriert. Abb. 5 gibt ein Beispiel. Die extrazellulären ([L] / [P])-Quotienten werden durch die Zahlen der mittleren Reihe angegeben. Die Fluoreszenz- und Absorptionsänderungen erfolgen reversibel und reproduzierbar und sind bei auf- und absteigender Titration identisch. Um die beobachteten Änderungen zu kalibrieren, wird NADH bekannter Konzentration (20, 40 und 100 μ M) als Standard in das Perfusat infundiert, wie im rechten Teil der Abb. 5 dargestellt ist.

3.2. Auswertung der Fluoreszenz- und Absorptionsinkremente.

Aus dem Vorangegangenen folgt, daß die beobachteten Fluoreszenz- und Absorptionsinkremente, ΔF bzw. ΔA , Inkrementen an reduzierten Pyridinnukleotiden zugeordnet werden dürfen. Sie resultieren aus Inkrementen des L/P-Quotienten im Perfusat:

$$\Delta \left(\frac{[L]}{[P]} \right) = \left(\frac{[L]}{[P]} \right) - \left(\frac{[L]}{[P]} \right)_b \quad (2)$$

wobei $\left(\frac{[L]}{[P]} \right)_b$ dem Basiszustand entspricht und in dem Abb. 4 dargestellten Versuch gleich 0,2 mM/0,2 mM = 1 ist. Für das LDH-System gilt:

$$\frac{K'_1}{[H^+]} = \frac{[P]}{[L]} \times \frac{[NADH]}{[NAD^+]} \quad (3)$$

oder

$$\frac{K'_1}{[H^+]} = \Delta \left(\frac{[P]}{[L]} \right) \times \Delta \left(\frac{[NADH]}{[NAD^+]} \right) \quad (3a)$$

Unter der Annahme eines Gleichgewichtes nach Schema (1) schreiben wir in Analogie zu (3):

$$\Delta \left(\frac{[L]}{[P]} \right) \times (K_2 \times K_3)' = \Delta \left(\frac{[Pr.NADH]}{[Pr.NAD^+]} \right) \quad (4)$$

Wobei

$$K'_2 = \frac{[P]}{[L]} \times \frac{[NADH]}{[NAD^+]} \quad (5)$$

$$K'_3 = \frac{[Pr.NADH]}{[Pr.NAD]} \times \frac{[NAD^+]}{[NADH]} \quad (6)$$

Unter den folgenden Voraussetzungen dürfen die beobachteten Fluoreszenz- und Absorptionsinkremente dem gebundenen cytosolischen NADH, abgekürzt mit Pr.NADH, zugeordnet werden. Dabei steht Pr für die Bindungsstellen für NADH bzw. NAD^+ . Es gilt: $\Delta [Pr.NADH] = [Pr.NADH] - [Pr.NADH]_b$ (7)
Die Voraussetzungen sind:

1. Ein möglicher Beitrag von Inkrementen von NADPH und extracytosolischem NADH kann in erster Näherung vernachlässigt werden, weil [Pyruvat] während der Versuche bei 0,2 mM konstant gehalten wird.

2. Der Beitrag von Inkrementen des freien cytosolischen NADH wird vernachlässigt, weil die Konzentration des freien NADH um zwei Größenordnungen kleiner ist als die des cytosolisch gebundenen NADH (vgl. unten und [5]).
3. Der Gehalt der cytosolischen Bindungsstellen für NAD^+ und NADH ist konstant. Diese Bindungsstellen werden einheitlich behandelt.
4. Der Anteil der freien Bindungsstellen ist gering und kann deswegen vernachlässigt werden (siehe unten).

Die Bindungsstellen werden gesättigt wenn $\Delta [L] / [P] \rightarrow \infty$, d.h.

$\Delta [\text{Pr.NADH}]$ wird maximal und gleich $[\text{Pr.NAD}]_b$. Der zelluläre Gehalt an cytosolischen Bindungsstellen ist somit anzugeben: $[\text{Pr.NADH}]_{\max} = [\text{Pr.NADH}]_b + \Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max}$ (8).

Gleichung (4) ist zu formulieren als:

$$\Delta \left(\frac{[L]}{[P]} \right) \times (K_2 \times K_3)' = \frac{[\text{Pr.NADH}]}{[\text{Pr.NAD}^+]} - \frac{[\text{Pr.NADH}]_b}{[\text{Pr.NAD}^+]_b} \quad (4a)$$

$$[\text{Pr.NAD}^+] = \Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max} - \Delta [\text{Pr.NADH}] \quad (9)$$

Durch Einsetzen von Gl. (7), (8) und (9) erhalten wir:

$$\Delta \left(\frac{[L]}{[P]} \right) \times (K_2 \times K_3)' = \frac{\Delta [\text{Pr.NADH}] + [\text{Pr.NADH}]_b}{\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max} - \Delta [\text{Pr.NADH}]} - \frac{[\text{Pr.NADH}]_b}{\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max}} \quad (4b)$$

$$\text{Mit } [\text{Pr.NADH}]_b = \left([L] / [P] \right)_b \times (K_2 \times K_3)' \times \Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max} \quad (10)$$

und durch Umformung von Gl. (4b) erhalten wir eine doppelt reziproke Beziehung:

$$\frac{1}{\Delta [\text{Pr.NADH}]} = \frac{1}{\Delta ([L] / [P])} \times \frac{\left([L] / [P] \right)_b + \frac{1}{(K_2 \times K_3)'}}{\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max}} + \frac{1}{\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max}} \quad (11)$$

$\Delta [\text{Pr.NADH}]$ entspricht ΔF bzw. ΔA und $\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\max}$ entspricht $\Delta F_{\max}$ bzw. $\Delta A_{\max}$; Gl. (11) wird dann:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta ([L] / [P])} \times \frac{([L] / [P])_b + \frac{1}{(K_2 \times K_3)'}}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{\Delta F_{\max}} \quad (12a)$$

und

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta ([L] / [P])} \times \frac{([L] / [P])_b + \frac{1}{(K_2 \times K_3)'}}{\Delta A_{\max}} + \frac{1}{\Delta A_{\max}} \quad (12b)$$

Wir erhalten somit eine doppelt reziproke Beziehung zwischen ΔF bzw. ΔA und $\Delta ([L] / [P])$.

3.3. Status des cytosolisch gebundenen NADH-Systems.

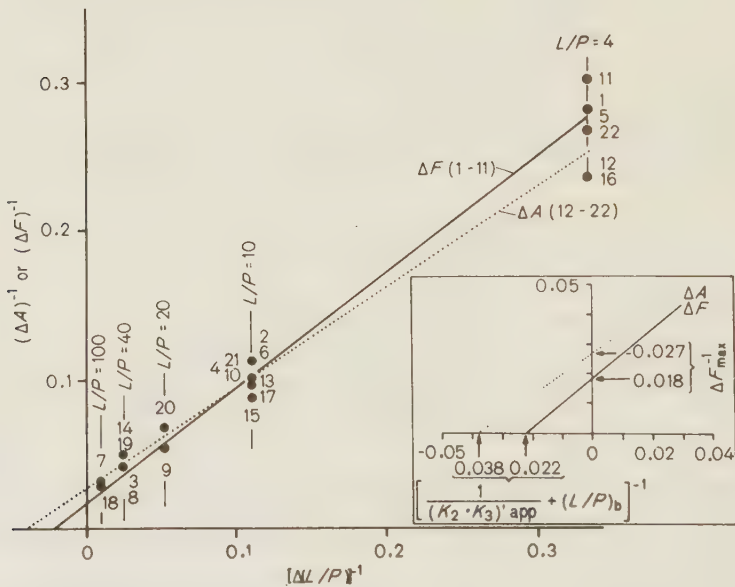


Abb. 6: Auftragung der reziproken Fluoreszenz (ΔF)- und Absorptions (ΔA)-Inkrementen gegen die Inkremente der extrazellulären $[Laktat] / [Pyruvat]$ -Quotienten gemäß Gl. (12a), (12b), von Versuch in Abb. 5. Der basale $[Laktat] / [Pyruvat]$ -Quotient ist 1.

Das Experiment der Abb. 5 wird entsprechend dem in Abschnitt 3.2 entwickelten Ansatz ausgewertet. Dazu tragen wir $\Delta(1/F)$ bzw. $\Delta(1/A)$ gemäß Gl. (12a) bzw. (12b) gegen $1/\Delta([L]/[P])$ auf (Abb. 6). Die Punkte 1 bis 11 in Abb. 6 zeigen die Titration für Fluoreszenz von dem Versuch in Abb. 5, 12 bis 22 für Absorption.

Der reziproke Ordinatenabschnitt ergibt für $\Delta F_{\max}$ $55,5 \times 1,3 = 72$ und für $\Delta A_{\max}$ $37 \times 1,6 = 59$ Skalenteile. Die Faktoren 1,3 und 1,6 ergeben sich aus der in der Auftragung von Abb. 5 verwendeten Normierung. Die Gleichgewichtskonstante $(K_2 \times K_3)'$ ist nach der Abb. 6. $2,3 \times 10^{-2}$. (Mittelwert: $2,2 \pm 0,25 \times 10^{-2}$, Zahl der Versuche $n = 15$) für die Fluoreszenztitration und $4,0 \times 10^{-2}$ für die Absorptionstitration. Die scheinbare Gleichgewichtskonstante für $[Laktat]/[Pyruvat]$ und freies $[NADH]/[NAD^+]$, K'_2 , ist bei pH 7,0 von der Größenordnung 10^{-4} [8, 9]. Daraus ergibt sich für K'_3 , der Gleichgewichtskonstanten für gebundenes $[Pr.NADH]/[Pr.NAD]$ und freies $[NADH]/[NAD^+]$, 200 bzw. 400 für Fluoreszenz bzw. Absorption. Der Quotient der Dissoziationskonstanten der Bindungsstellen für NAD^+ , K_{NAD^+} , und für $NADH$, K_{NADH} , ist $K_{NAD^+}/K_{NADH} = (K_2 \times K_3)'/K'_2 = 200$ bzw. 400 bei einem zellulären pH von 7. Das cytosolische $NADH$ ist somit 200 bis 400 mal fester an Protein gebunden als NAD . Der Reduktionsgrad des cytosolisch gebundenen $NADH$ -Systems bei verschiedenen L/P wird nach Gl. (13) berechnet und in Abb. 7 aufgetragen.

$$\frac{[Pr.NADH]}{[Pr.NAD^+] + [Pr.NADH]} = \frac{([L]/[P]) \times (K_2 \times K_3)'}{1 + ([L]/[P]) \times (K_2 \times K_3)'} \quad (13)$$

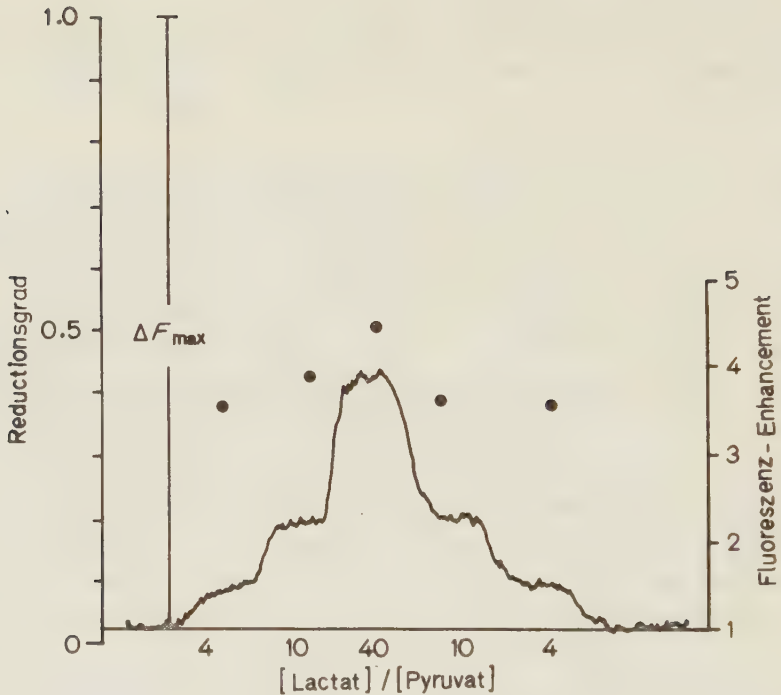


Abb. 7: Kalibrierung der NADH-spezifischen Fluoreszenzänderungen der mit verschiedenen extrazellulären[Laktat]/ [Pyruvat] -Quotienten perfundierten Rattenleber nach Abb. 5. Die Reduktionsgerade (NADH/NADH + NAD) (linke Ordinate) und Enhancement-Faktoren der Fluoreszenz (rechte Ordinate), berechnet als $(\Delta F / \Delta A)_{L/P} / (\Delta F / \Delta A)_{NADH}$ bei verschiedenen extrazellulären[Laktat]/[Pyruvat]-Quotienten werden dargestellt.

Die Skala des Reduktionsgrades wird zunächst in Skalenteilen der Fluoreszenz angelegt. Man sieht, daß die Zustände 0 und 1, d.h. völlig oxidiert und völlig reduziert, extrapoliert werden können. Die Kalibrierung des Zellulargehalts der cytosolischen Bindungsstellen wird auf folgende Weise durchgeführt:

$$\begin{aligned} \Delta [\text{Pr.NADH}]_{\text{max}} &= \Delta F_{\text{max}} \times \frac{\mu\text{M NADH infundiert} \times V_e}{\Delta F_{\text{NADH infundiert}} \times \text{Enhancement F.} \times W} \quad (14) \\ &= 71 \times \frac{100 \mu\text{M} \times 0,4 \text{ ml/gr Lebergewebe}}{10 \times 3,9 \times 0,6 \text{ gr Leberzellen/gr Lebergewebe}} \\ &= 123 \text{ nMol/gr Leberzellen} \end{aligned}$$

Die Gesamtbindungsstellen betragen: $\Delta [\text{Pr.NADH}]_{\text{max}} (1 + K'_2 \times K'_3) = 125 \text{ nMol/gr Leberzellen}$, oder $125 \times 0,8 = 100 \text{ nMol/gr Lebergewebe}$.

$$\begin{aligned} \text{Oder } \Delta [\text{Pr.NADH}]_{\text{max}} &= \Delta A_{\text{max}} \times \frac{\mu\text{M NADH infundiert} \times V_e}{\Delta A_{\text{NADH infundiert}} \times W} \quad (15) \\ &= 59 \times \frac{100 \mu\text{M} \times 0,4 \text{ ml/gr Lebergewebe}}{52 \times 0,6 \text{ gr Leberzellen/gr Lebergewebe}} \\ &= 76 \text{ nMol/gr Leberzellen} \end{aligned}$$

Dabei ist:

$$\begin{aligned} V_e &= \text{ml Extrazellulärraum/gr Lebergewebe} = {}^{14}\text{C-Inulin-Raum} \\ &= 0,4 \text{ ml/gr Lebergewebe} \end{aligned}$$

$$W = \text{gr Leberzellen/gr perfundierte Leber} = 0,6$$

$$1 \text{ gr Lebergewebe feucht} = 0,8 \text{ gr Leberzellen}$$

$$\text{Enhancement Faktor} = 3,9$$

Aus dem Vorangegangenen errechnen wir für $[I] / [P] = 10$ einen Zellargehalt des cytosolisch gebundenen NADH; $\{\text{Pr.NADH}\}$, von im Mittel $20 \text{ nMol/gr Leberzellen}$ für Fluoreszenz und Absorption. Die Konzentration des freien NAD^+ , $[\text{NAD}^+]$ ist $0,5 \text{ mM}$, wie aus Relaxationsmessungen berechnet wurde [4, 10]. Bei $0,5 \text{ ml cytosolisches H}_2\text{O pro gr Leberzellen}$ ergibt sich $250 \text{ nMol freies NAD}^+/\text{gr Leberzellen}$. Nach Gl. (5) beträgt der Gehalt an freiem NADH $0,25 \text{ nMol/gr Leberzellen}$, somit

$$\frac{\{\text{NADH}\}}{\{\text{Pr.NADH}\}} = \frac{0,25 \text{ nMol/gr Leberzellen}}{20,0 \text{ nMol/gr Leberzellen}},$$

d.h. Bei Normoxie liegt nur 1% des cytosolischen NADH in freier Form vor.

3.4. Gewebsgehalte von Pyridinnukleotiden und extrazellulärer [L] / [P]-Quotient.

Der Einfluß des extrazellulären [L] / [P]-Quotienten auf die Gewebsgehalte der Pyridinnukleotide wird in Tab. 1 dargestellt. Der Gehalt an NADH steigt signifikant an bei dem Übergang von [L] / [P] = 1 auf [L] / [P] = 100. Der NADPH-Gehalt bleibt jedoch konstant. Der $\{ \text{NADH} \} / \{ \text{NAD} \}$ -Quotient steigt um den Faktor 3, während der $\{ \text{NADPH} \} / \{ \text{NADP} \}$ -Quotient konstant bleibt.

Tab. 1: Der Gewebsgehalt $\{ \}$ von NADH, NAD, NADPH, NADP der perfundierten Rattenleber bei verschiedenen extrazellulären L/P-Quotienten. Zahl der Versuche in Klammern

L/P im ein- tretenden (in nMol/gr Lebergewebe Perfusat	$\{ \text{NADH} \}$	$\{ \text{NAD} \}$	$\frac{\{ \text{NADH} \}}{\{ \text{NAD} \}}$	$\{ \text{NADPH} \}$	$\{ \text{NADP} \}$	$\frac{\{ \text{NADPH} \}}{\{ \text{NADP} \}}$
	(in nMol/gr Lebergewebe f.)			(in nMol/gr Lebergewebe f.)		
1	30 $\pm$ 6 (6)	439 $\pm$ 23 (8)	0,07	215 $\pm$ 7 (7)	103 $\pm$ 9 (8)	2,1
100	93 $\pm$ 17 (6)	448 $\pm$ 39 (6)	0,2	193 $\pm$ 28 (6)	84 $\pm$ 16 (6)	2,3

3.5. Äquilibrierung zellulärer Metabolitpaare mit dem extrazellulären [L] / [P]-Quotient.

Das Glycerophosphatdehydrogenase-System wird als ein Beispiel für Metabolitsysteme entsprechend Schritt (4) in Schema (1) herangezogen. Das Metabolitpaar $\{ \alpha\text{-Glycerophosphat} \}$, $\{ G \}$, und $\{ \text{Dihydroxyacetonphosphat} \}$, $\{ D \}$, tritt praktisch nicht im Extrazellulärraum auf, und mögliche intrazelluläre Gradienten werden hier für beide Metabolite gleich behandelt. In Tab. 2 werden $\{ G \}$ - und $\{ D \}$ -Messungen bei definiertem [L] / [P]-Quotienten dargestellt. Der Quotient $\{ G \} / \{ D \}$ ist mit dem [L] / [P]-Quotienten im eintretenden Perfusat korreliert, wie aus dem Vergleich der Spalten (13) und (17) hervorgeht. In Abb. 8 werden diese und weitere Messungen graphisch dargestellt. Die berechnete Regressionsgerade hat für das eintretende Perfusat,

$([L]/[P])_{\text{ein}}$ eine Steigung von 0,65 und für das austretende Perfusat $([L]/[P])_{\text{aus}}$ eine Steigung von 0,54. Der Quotient der Gleichgewichtskonstanten der LDH- und der GDH-Reaktion beträgt etwa 0,6, wie aus Messungen von Rüßmann [7] hervorgeht. Er ist von der Ionenstärke und von der Art der Elektrolyte abhängig. Eine weitgehende Äquilibration des $[L]/[P]$ - und $[G]/[D]$ -System ist somit auch über den Bereich von $[L]/[P] = 1$ bis $[L]/[P] = 80$ anzunehmen. Für den Status der normoxischen Versorgung der Rattenleber in situ fanden Hohorst, Kreutz und Bücher [2] einen Quotienten von $6,7/12,9 = 0,52$ für $[L]/[P]/\{G\}/\{D\}$.

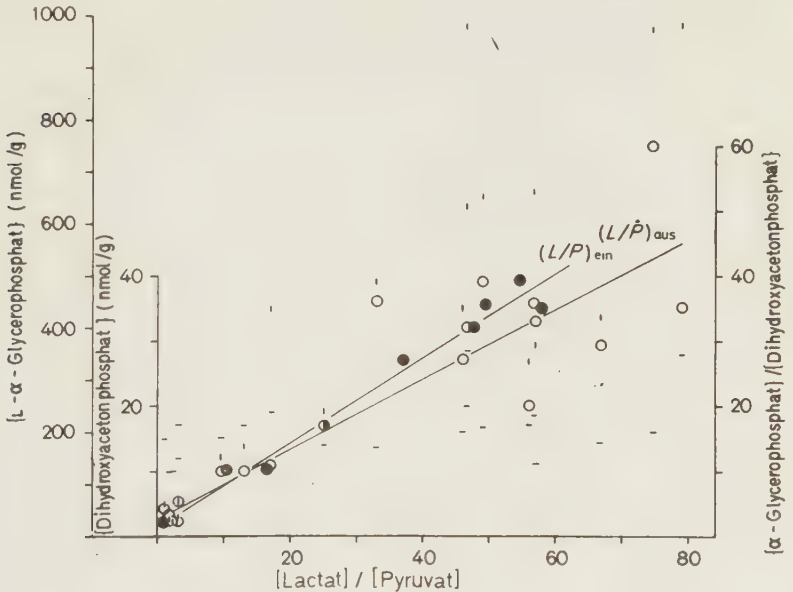


Abb. 8: Gewebsgehalt (in nMol/gram Lebergewebe feucht) von L- α -Glycerophosphat $\{G\}$ (·) und Dihydroxyacetonphosphat $\{D\}$, (-) der mit verschiedenen extrazellulären $[Laktat] / [Pyruvat]$ -Quotienten perfundierten Rattenleber. Die $\{G\}/\{D\}$ -Quotienten (rechte Ordinate) werden gegen die extrazellulären $[Laktat] / [Pyruvat]$ -Quotienten (Absziss) des eintretenden (·) und austretenden (o) Perfusats aufgetragen.

Versuch	Laktat [L]				Pyruvat [P]				α -Glycero- phosphat (G)	Dihydro- xyaceton- phosphat (D)	L/P				$\frac{G}{D}$		
	Perfusat		Gewebe		Perfusat		Gewebe				Perfusat		Gewebe				
	ein	aus	Probe	Zelle	ein	aus	Probe	Zelle	Probe	Zelle	ein	aus	Probe	Zelle			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)
	nMol/ml		nMol/gr		nMol/gr		nMol/gr		nMol/gr		nMol/gr		nMol/gr		nMol/gr		
102	182	324	842	1210	193	101	136	128	39	65	12	29	1,0	3,2	6,2	9,5	2,2
106, 109	2000	2150	2130	2160	156	195	118	80	163	270	16	27	12,8	10,9	18	27	10
116, 119, 123.	7770	7750	5600	4160	154	154	74	18	651	1080	19	31	49	49	71	240	35
110, 125, 129, 133.	19660	18850	11390	6150	158	90	55	9	650	1080	8	14	124	210	207	685	77

Tab. 2: Metabolitkonzentration im Perfusat und Metabolitgehalt des Gewebes.

Der Zellulargehalt = $\frac{\text{Gewebssgehalt} - 0,4 \times \text{Perfusatkonzentration}}{1 - 0,4}$

Der Faktor 0,4 ist der gemessene ^{14}C -Inulin-Carboxylat Raum.

3.6. Permeationsgleichgewicht zwischen extrazellulären und zellulären
[L] / [P]-Quotienten.

Die Annahme eines Permeationsgleichgewichts gemäß Schritt (1) in Schema (1) dürfte auf Grund mehrerer Hinweise berechtigt sein [2]. Einer der experimentell zugänglichen Hinweise ergibt sich aus der Betrachtung der Wasserstoffionenbewegungen während des Ausgleiches von Laktat- oder Pyruvatgradienten zwischen extrazellulärem und zellulärem Raum. Wie die Abb. 9 zeigt, treten im austretenden Perfusat bei der stufenweisen Änderung des [L] / [P] -Quotienten pH-Änderungen auf, die als Ausdruck der Permeation der undissoziierten Säure durch die Zellmembran gedeutet werden [5]. Durch Integration der pH-Übergänge erhält man Kurven, welche nahezu deckungsgleich mit den Fluoreszenzübergängen sind.

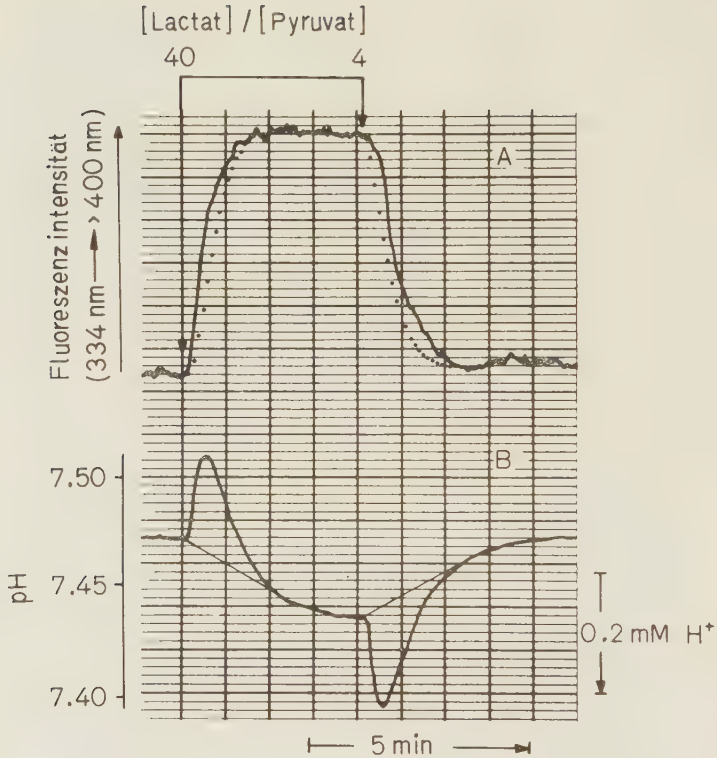


Abb. 9: Änderungen der Fluoreszenz bei der NADH-spezifischen Wellenlänge (oben) und des pH (unten) bei Erhöhung des extrazellulär perfundierten $\frac{[\text{Laktat}]}{[\text{Pyruvat}]}$ -Quotienten von 4 auf 40 und Erniedrigung von 40 auf 4. $[\text{Pyruvat}] = 0,2 \text{ mM}$, $[\text{Laktat}] = 0,8$ bzw. $8,0 \text{ mM}$. Die in der oberen Kurve eingetragenen Punkte wurden durch Integration aus der unteren Kurve erhalten.

4. Diskussion.

Die beschriebenen Messungen an der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber dürfen für das System des Schema (1) als Hinweis einer weitgehenden Äquilibration gewertet werden. Hierauf wird in Abschnitt 4.2. eingegangen. Zunächst sollen die aus den Messungen abzuleitenden Schlussfolgerungen diskutiert werden.

4.1. NADH-bindendes System des Cytosols.

Theorell wies in umfangreichen Untersuchungen auf die Eigenschaft der isolierten Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber hin, die Fluoreszenzausbeute des NADH durch Bindung zu erhöhen [11]. Auch die sich durch die Bindung ergebende Positivierung des Mittelpotentials wurde an diesem System diskutiert. An anderen isolierten Dehydrogenasen wurden ebenfalls solche Befunde erhoben. Wir beobachten für die Bindungsstellen des NADH im Cytosol ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzausbeute. Der sogenannte "Enhancement-Faktor" beträgt ca. 3,9. Er ist in unseren Versuchen jedoch nicht konstant, sondern nimmt mit dem $[L] / [P]$ -Quotienten zu, wie in Abb. 7 angedeutet.

Die Positivierung des Mittelpotentials des NADH läßt sich aus den Gleichgewichtskonstanten berechnen, die mit der doppelt reziproken Beziehung zwischen optischen Inkrementen und dem $[L] / [P]$ -Inkrement (Gl. 12a, b) erhalten wird.

$$E'_{\text{o NADH gebunden}} = E'_{\text{o NADH frei}} - \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{K_{\text{NADH}}}{K_{\text{NAD}^+}} \quad (16)$$

Das berechnete Mittelpotential des gebundenen NADH im cytosolischen Raum der Rattenleber beträgt -257 mV (-250 für Absorption und -265 mV für Fluoreszenz). Das Mittelpotential des freien NADH, $E'_{\text{o NADH frei}}$ ist -337 mV. [4]. Die beobachteten Änderungen der NADH-spezifischen Fluoreszenz und Absorption in Abb. 5 sind durch das gebundene NADH-System bedingt.

Die cytosolische Bindungskapazität beträgt 100 nMol Bindungsstellen pro gr Leberfeuchtgewicht für Fluoreszenz und 63 nMol Bindungsstellen

len pro gr Leberfeuchtgewicht für Absorption (vgl. 3.3.). Die unterschiedlichen Resultate überstreichen etwa den Bereich des experimentellen Fehlers. Eine genaue Analyse dieser Diskrepanz erfordert weitere Untersuchungen. In der zitierten Untersuchung [5] wurden Daten aus der Literatur zusammengestellt, welche die NADH Bindungsstellen einiger Dehydrogenase summieren. Für α -Glycerophosphatdehydrogenase, Laktatdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Alkoholdehydrogenase wurden insgesamt 59 nMol Bindungsstellen /gr Leberfeuchtgewicht gefunden. Ob ein spezifisches NADH-bindendes cytosolisches Protein ohne bekannte enzymatische Aktivität vorliegt [4], muß gegenwärtig noch offengelassen werden. Bei der Auswertung wurde, wie oben erwähnt, der Anteil der freien Bindungsstellen vernachlässigt. Eine einfache Betrachtung zeigt, daß dafür die Bedingung $K_{\text{NAD}^+} \ll [\text{NAD}^+]_{\text{frei}}$ gilt. Rechnet man mit $[\text{NAD}^+]_{\text{frei}}$ von 500 μM [4, 9] und $K_{\text{NAD}^+} = 80 \mu\text{M}$ [12], so ergibt sich der Anteil der freien Bindungsstellen nach der Gleichung (17):

$$\frac{[\text{Pr. total}]}{[\text{Pr. NAD}^+]} = \frac{K_{\text{NAD}^+}}{[\text{NAD}^+]} + 1 + (K_2 \times K_3) \times \frac{[\text{Laktat}]}{[\text{Pyruvat}]} \quad (17)$$

Tab. 3: Berechnung der Besetzung der cytosolischen Bindungsstellen, Pr, bei verschiedenen $[\text{L}] / [\text{P}]$ -Quotient.

Berechnung nach Gleichung (17), wobei $K_{\text{app geb}} = 2,3 \times 10^{-2}$ und

$$\text{Pr}_t = \text{Pr}_{\text{frei}} + \text{Pr}_{\text{NAD}^+} + \text{Pr}_{\text{NADH}} = 1. \quad K_{\text{NAD}^+} = 80 \mu\text{M}, \quad [\text{NAD}]_{\text{frei}} = 500 \mu\text{M}.$$

L/P	Pr_{frei}	Pr_{NAD}	Pr_{NADH}	$\text{Pr}_{\text{NADH}} / (\text{Pr}_{\text{NADH}} + \text{Pr}_{\text{NAD}})$
1	0.14	0.85	0.02	0.023
4	0.13	0.80	0.07	0.08
10	0.12	0.72	0.17	0.19
40	0.08	0.48	0.44	0.48
100	0.05	0.29	0.67	0.70

In Tabelle 3 ist für einige $[\text{L}] / [\text{P}]$ -Quotienten die Verteilung der Bindungsstellen Pr aufgezeigt.

4.2. Äquilibrierung nach Schema (1) auf Seite 2

Für Schritt (1) werden die mit dem Ausgleich der extra- und intrazellulären Konzentrationsdifferenz des Laktats gekoppelten Wasserstoffionenbewegungen herangezogen. Eine weitgehende Äquilibrierung geht aus Abb. 9 hervor. In der Abb. 9 wird jedoch nicht nur Schritt (1), sondern es werden auch Schritte (2) und (3) erfaßt, da die Fluoreszenzintensität nach den obigen Betrachtungen dem gebundenen NADH entspricht. Bezüglich Schritt (4) wird die lineare Beziehung zwischen $\{\alpha\text{-Glycerophosphat}\} / \{\text{Dihydroxyacetonphosphat}\}$ und $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}]$ herangezogen. Der Wert des Quotienten $\frac{\{\alpha\text{-Glycerophosphat}\}}{[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}]}$

liegt nahe dem Quotienten der entsprechenden Gleichgewichtskonstanten. Dies gilt jedoch nicht für $\frac{\{\alpha\text{-Glycerophosphat}\}}{\{\text{Laktat}\} / \{\text{Pyruvat}\}}$.

Die möglichen Gründe der Abweichung sind:

1. Die während der Gewebsentnahme mit der Frierstop-Methode eintretende Verschiebung des Laktat- und Pyruvatgehalts.
2. Gradienten im extrazellulären Raum.
3. Ungleiche Permeabilität durch die Plasmamembran für Laktat und Pyruvat.
4. Die Korrektur für den extrazellulären Raum. Eine geringfügige Abweichung des ^{14}C -Inulin-Caroxylat-Raums (Mittelwert 0,4 ml/gr Leberfeuchtgewicht) hat vergleichsweise beträchtliche Änderungen des daraus berechneten zellulären $\{\text{Laktat}\} / \{\text{Pyruvat}\}$ -Quotienten zur Folge.

Dabei erscheint die Unzulänglichkeit des Frierstops hinsichtlich der Laktatdehydrogenase-Reaktion der wesentliche Faktor zu sein. In dieser Hinsicht ist die Bestimmung des Gewebsgehalts von α -Glycerophosphat und Dihydroxyacetonphosphat sinnvoller. Die beiden Metaboliten sind nur intrazellulär vorhanden. Die Aktivität der Glycerophosphatdehydrogenase der Rattenleber (38 U/gr Leber feucht) beträgt 1/6 von der Laktatdehydrogenase, (233 U/gr Leber feucht). [14]. Die möglichen obengenannten Fehlerquellen von 2 bis 4 kommen bei diesen Metabolitpaar nicht in Frage.

4.3. Plasma $[L]/[P]$ -Quotient und Gewebs $\{L\} / \{P\}$ -Quotient

Die Diskrepanz der $[L]/[P]$ -Quotienten, welche an der perfundierten Rattenleber zwischen dem Perfusat und dem berechneten Zellraum gefunden wird (Tab. 2), läßt sich auch für die Quotienten der gemessenen Gewebsgehalte von Organen in situ feststellen (Tab. 4). Dies ist besonders bei solchen metabolischen Zuständen der Fall, welche Abweichungen vom Zustand der normoxischen und gefütterten Ratte darstellen. In Tab. 4 werden Werte für den Zustand bei gehungerten Ratten verwendet. Hier geht der berechnete Zellulargehalt von Pyruvat gegen Null. Die zellphysiologische Verwendung der bisher gemessenen Gewebsquotienten des Laktats und Pyruvats bedarf somit besonderer Sorgfalt. Die Perfusatquotienten des Laktats und Pyruvats dürften einen weiteren Anwendungsbereich haben. Kürzliche Untersuchungen von Opie und Mansford [17] am perfundierten Herzen haben zu analogen Schlußfolgerungen für dieses Organ geführt.

Tab. 4: Der Gewebsgehalt von Laktat und Pyruvat der Rattenleber nach 24 - 48 h Nahrungsentzug. Der Zellulargehalt wird nach der Formel:

$$\text{Zellulargehalt} = \frac{\text{Gewebsgehalt} - 0,182 \times \text{Plasmakonzentration}}{1 - 0,182}$$

gerechnet. Der Faktor $0,182 \pm 0,017$ ist der ^{14}C -Inulin-Carboxylat-Raum der gehungerten Rattenleber.

Probe	Referenz	Gewebsgehalt nMol/gr Lebergewebe feucht		Zellulargehalt nMol/gr Leberzellen feucht	
		Laktat	Pyruvat	Laktat	Pyruvat
Leber	[14]	836	22	307	-19
	[15]	780	47	237	12
	[16]	510	40	-93	3
	[*]	874 ± 39 (4)	$32,6 \pm 3,6$ (5)	353	-6
nMol/ml Plasma					
Plasma	[*]	3215 ± 288 (7)	206 ± 24 (7)		

*) Von H. Sies u. R. Waltenspiel gemessene Daten. Zahl der Versuche in Klammern.

5. Zusammenfassung

Der Redoxstatus des Coenzyms NAD im cytosolischen Raum bei experimentell variablem extrazellulärem Redoxpotential wird photometrisch bzw. durch Metabolitanalysen verfolgt. Die Fluoreszenz- und Absorptionsänderungen erfolgen reversibel und reproduzierbar und sind bei auf- und absteigender Titration mit extrazellulären $[\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}]$ -([L] / [P])-Quotienten identisch. Diese Redoxtitration des NAD-Systems mit extrazellulären [L] / [P]-Quotienten erlaubt die mathematische Extrapolation des völlig reduzierten und oxydierten gebundenen NAD im cytosolischen Raum. Dadurch wird der Zellulargehalt der cytosolischen NADH-Bindungsstellen, 125 nMol pro Leberzellen für Fluoreszenz und 76 nMol pro gr Leberzellen für Absorption, sowie die Verteilung der einzelnen Anteile dieser Bindungsstellen für NAD^+ und NADH bei verschiedenen extrazellulären [L] / [P]-Quotienten berechnet. Das cytosolische NADH ist 200 bis 400 mal fester an Protein gebunden als NAD. Durch mathematische Extrapolation errechnen wir die scheinbare Gleichgewichtskonstante für das gebundene NADH/NAD und $[\text{L}] / [\text{P}]$ $2,3 \times 10^{-2}$ für Fluoreszenz und 4×10^{-2} für Absorption. Das Mittelpotential des gebundenen NADH wird aus diesen Gleichgewichtskonstanten berechnet und beträgt -257 mV gegenüber -337 mV des freien NADH. Das Permeationsgleichgewicht zwischen extra- und zellulärem Raum wird durch die reversible Wasserstoffionenbewegungen während des Ausgleichs von Laktat- oder Pyruvatgradienten zwischen den beiden Räumen wahrscheinlich gemacht. Der gemessene Quotient

$$\frac{\{ \alpha\text{-Glycerophosphat} \}}{([\text{Laktat}] / [\text{Pyruvat}]) \text{ extrazellulär}} / \{ \text{Dihydroxyacetonphosphat} \}$$

ist gleich 0,65 für das eintretende Perfusat und 0,54 für das austretende Perfusat. Dieser Quotient entspricht dem Quotienten der Gleichgewichtskonstanten der Laktatdehydrogenase- und der Glycerophosphatdehydrogenase-Reaktion, 0,6.

Der Zellulargehaltsquotient für Laktat und Pyruvat ist derzeit noch mit Fehlerquellen behaftet, welche überwiegend aus dem nicht genügend schnell erfolgenden Frierstop resultieren. Dies gilt auch für die zahl-

reichen Daten der Literatur über den Status des NAD-Systems der Rattenleber in situ, welche aus unkorrigierten Gewebsgehaltsquotienten stammen.

Literatur

1. Th. BÜCHER und M. KLINGENBERG, Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation, Angew. Chemie 70, 552, 1958.
2. H.J. HOHORST, F.H. KREUTZ und Th. BÜCHER, Über Metabolitgehalte und Metabolit-Konzentrationen in der Leber der Ratte, Biochem.Z. 332, 18, 1959.
3. HOLZER, H., SCHULTZ, G. und LYNEN, F., Bestimmung des Quotienten DPNH/DPN in lebenden Hefezellen durch Analyse stationärer Alkohol- und Acetaldehyd-Konzentration, Biochem.Z. 328, 252, 1956.
4. Th. BÜCHER, The State of the DPN System in Liver. An Analysis of Pyridine Nucleotide Levels, Surface Fluorescence, and Redox Potentials of Indicator Metabolite Couples in the Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver, 439 in Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenase, (H. Sund ed.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1970.
5. Th. BÜCHER, B. BRAUSER, A. CONZE, F. KLEIN, O. LANGGUTH und H. SIES, State of Oxidation-Reduction and State of Binding in the cytosolic NADH-System as Disclosed by Equilibration with Extracellular Lactate/Pyruvate in Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver, Eur.J.Biochem. 27, 301, 1972
6. H. SIES, S.T. TA, B. BRAUSER und Th. BÜCHER, Direct Measurement of the Lactate Dehydrogenase System in Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver, Advances in Enzyme Regulations, Vol. 10, 309, 1972.
7. M. KLINGENBERG, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide, Spektrophotometrische und fluorimetrische Verfahren, 1975 in Methoden der enzymatischen Analyse, (H.U. BERGMAYER ed.), 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
8. RÜSSMANN, W., Dissertation, Medizinische, 1967.
9. WILLIAMSON, D.H., LUND, P. & KREBS, H.A., The Redox State of Free Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide in the Cytoplasm and Mitochondria of Rat Liver, Biochem.J. 103, 514, 1967.

10. REMOLD-O'DONNELL, E., Diplomarbeit, München, 1967.
11. H. THEORELL, Kinetics and equilibria in the liver alcohol dehydrogenase system, 31 in Advances in Enzymology, Vol.20, F.F. Nord, ed, Interscience Publishers Ltd, London, New York, 1958.
12. THEORELL, H. und WINER, A.D., Dissociation Constants of the Liver Alcohol Dehydrogenase Coenzyme Complexes, Arch. Biochem. Biophys. 83, 291, 1959
13. Th. BÜCHER und W. RÜSSMANN, Gleichgewicht und Ungleichgewicht im System der Glykolyse, Angew.Chem. 75, 881, 1963: Equilibrium and Nonequilibrium in the Glycolysis System, Angew.Chem.Intern.Ed. Engl., 3, 426, 1964
14. H.J. HOHORST, F.H. KREUTZ, M. REIM und H.J. HÜBENER, The oxidation/reduction state of the extramitochondrial DPN/DPNH system in rat liver and the hormonal control of substrate levels in vivo, Biochem.Biophys.Res. Commun 4, 163, 1961.
15. H.A. KREBS, The redox state of nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, Advances in Enzyme Regulation 5, 409, 1966.
16. A.L. GREENBAUM, K.A. GUMAA and P. McLEAN, The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status, Arch.Biochem.Biophys. 143, 617, 1971.
17. LIONEL H. OPIE and K.R.L. MANSFORD, The Value of Lactate and Pyruvate Measurements in the Assessment of the Redox State of Free Nicotinamide-Adenine Dinucleotide in the Cytoplasm of Perfused Rat Heart, Eur.J.clin.Invest. 1, 295, 1971.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor
Dr. Dr. Th. Bücher danke ich für die Anleitung
zum wissenschaftlichen Arbeiten. Ebenfalls Herrn
Privatdozent Dr. H. Sies und Frau R. Waltenspiel
möchte ich herzlich für die ständige Unterstützung
bei der Ausführung dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Als erstes von fünf Kindern des Kaufmannes Chin Sen, TA und seiner Ehefrau, Tien Tie, geb. TAN, wurde ich Sioe Tjin, TA (Rafael, RACHMAT) am 27.5.44 in Medan, Sumatra, Indonesien, geboren.

Von 1950 bis 1956 besuchte ich "Su Tong Primary School" in Medan, anschließend sechs Jahre lang die "S.M.A. Setia", in der ich meine Reifeprüfung im Sommer 1962 ablegte.

Im Herbst 1965 kam ich nach Deutschland und lernte zuerst Deutsch im "Goethe Institut". Im Wintersemester 1966/65 fing ich mein Medizinstudium an der Universität München an, an der ich im WW. 1966/67 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im SS. 1968 die ärztliche Vorprüfung und im Juli 1972 die ärztliche Prüfung bestand. Im Winter 1971 beendete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität München bei Herrn Prof. Dr. Dr. Th. Bücher und Herrn Priv. Doz. H. Sies die experimentelle Durchführung meiner Dissertation. Zur Zeit bin ich Medizinalassistent an der II. Kinderklinik des städtischen Krankenhauses München-Schwabing.

